

УДК 616-007.43-089.844:576.524

Адгезионный интерфейс для применения аутологичных клеток в герниопластике

Д.Р. Петренев, В.В. Берещенко, Е.В. Воропаев, А.Н. Лызигов

Рубрики: 76.29.46; 76.09.41; 34.57.21; 76.09.31

НИР: «Разработать и внедрить клеточные технологии для оптимизации репаративных процессов поврежденного железистого эпителия и сосудистых компонентов органов».

Сроки выполнения НИР: январь 2011 г. — декабрь 2013 г.

Научный руководитель: д-р мед. наук, проф. А.Н. Лызигов.

Источник финансирования: госбюджет.

Герниопластика — наиболее часто выполняемая операция в хирургических отделениях общего профиля. Многочисленными исследованиями убедительно доказаны преимущества операций с применением дополнительных пластических материалов перед традиционными способами. В то же время использование имплантационных технологий вызывает ряд осложнений в месте протезирования. Основные причины осложнений — инфицирование протеза и нарушение процессов регенерации соединительной ткани. Первая проблема решается за счет использования сетчатых эндопротезов, изготовленных из монофиламентной полипропиленовой нити. Их структура и низкая адгезионность обеспечивает наименьшую вероятность инфицирования эндопротеза. Вторая проблема может быть преодолена путем введения аутологичных фибробластов или мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в область регенерации. Эти клетки продуцируют большое количество ростовых факторов, что в свою очередь обеспечивает ускорение процессов ремоделинга тканей, сокращение сроков выздоровления и снижение риска развития осложнений.

Тем не менее, практическое использование клеточных технологий в герниопластике ограничено низкими адгезивными свойствами полипропиленовых протезов. Фактически закрепление клеток на поверхности полипропиленового эндопротеза наблюдается в области узлов и пересечения нитей. Таким образом, разработка способов фиксации аутологичных клеток на его поверхности является актуальной задачей.

Цель — изучить возможность фиксации живых аутологичных фибробластов на сетчатом полипропиленовом эндопротезе посредством формирования адгезионного интерфейса для клеток на его поверхности.

Для изучения процессов клеточной адгезии *in vitro* использовали хирургическую сетку (диаметр нити 0,12 мм, толщина сетки 0,5 мм, поверхностная плотность 62 г/м², объемная пористость 85%). Диски из сетки ø 55 мм стерилизовали в плазме Н₂О₂. Адгезионный интерфейс из поликапролактона формировали на поверхности сетки методом испарения растворителя на стеклянной подложке в ламинарном потоке воздуха.

Динамику роста клеток *in vitro* на поверхности сетчатого протеза изучали с применением первичных фибробластов. Для этого в чашки Петри (ЧП) ø 60

мм помещали образцы сетки, вносили 5 мл суспензии клеток (2×10^6 кл) в полной среде (DMEM, 41966 GIBCO; L-глутамин 4 мМ; 10 мМ HEPES; 1% антибиотик/антимикотик; 10% ЭТС) и инкубировали при 37°C и 5% CO₂. Замену среды проводили 2-3 раза в неделю. Прижизненное микроскопирование образцов в проходящем свете производили на инвертированном микроскопе типа XDS-3FL4. На 14 сут сетки отмывали, фиксировали 2% параформальдегидом и выполняли флуоресцентные исследования.

Культуру первичных фибробластов кожи крысы (Вистар) получали стандартным методом изоляции фибробластов, мигрирующих из эксплантатов. Рутинное культивирование проводили в полной среде при 37°C и 5% CO₂ в 60 мм ЧП для культивирования адгезионных культур (83.1801 SARSTEDT). В эксперимент брали клетки пятого пассажа.

На ранних этапах культивирования наблюдали практически полное отсутствие адгезии фибробластов к полипропиленовой хирургической сетке, что соответствует ранее полученным результатам для МСК. Через 24 ч после внесения клеток в ЧП в области узлов сетки и на пересечении нитей выявляли единичные клеточные элементы. Остальные клетки формировали монослой на дне ЧП. В ЧП с сеткой с покрытием клетки были сосредоточены на полимерном покрытии в виде кластеров. На 3 сут культивирования при увеличении количества клеток вышеописанный характер их распределения между поверхностью ЧП и эндопротезом сохранялся (рис. 1).

На 7 сут в ЧП с контрольными образцами наблюдали формирование 100% монослоя с характерными признаками старения клеточной популяции. Также отмечали начало восходящего прорастания монослоя через узлы сетки. Ранее сообщалось о похожем феномене в культуре МСК. В ЧП с сетками с покрытием клетки на поверхности чашек имели распластанную морфологию с большим количеством отростков при плотности монослоя от 20 до 70%. Клетки на поверхности полимерного покрытия замедлили рост и приобрели более компактную форму.

На 7 сут в ЧП с контрольными образцами наблюдали формирование 100% монослоя с характерными признаками старения клеточной популяции. Также отмечали начало восходящего прорастания монослоя через узлы сетки. Ранее сообщалось о похожем феномене в культуре МСК. В ЧП с сетками с покрытием клетки на поверхности чашек имели распластанную морфологию с большим количеством отростков при плотности монослоя от 20 до 70%. Клетки на поверхности полимерного покрытия замедлили рост и приобрели более компактную форму.

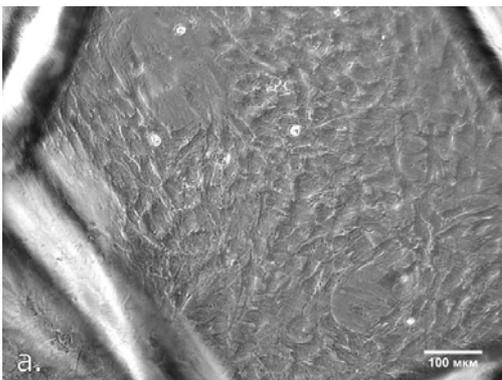
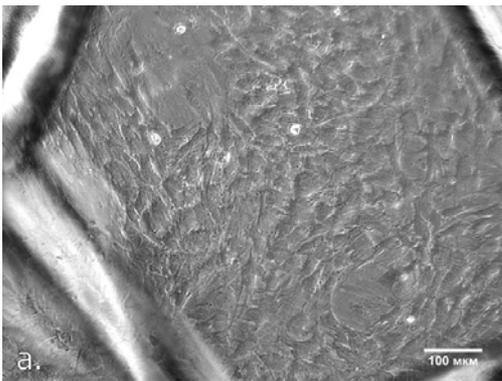
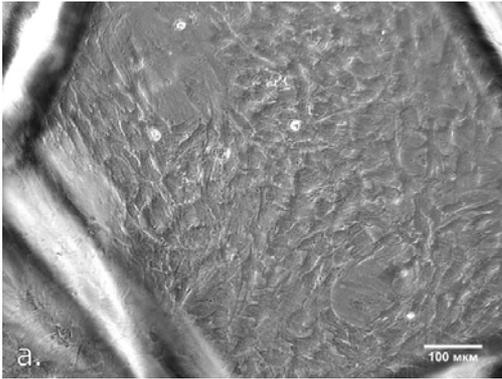
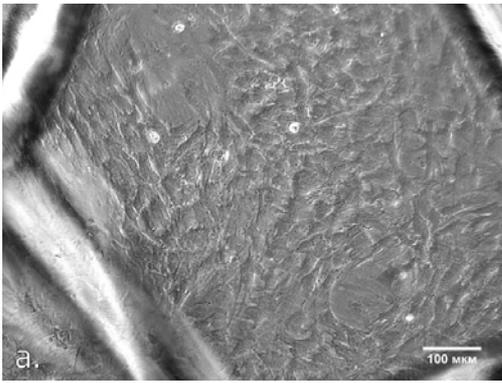
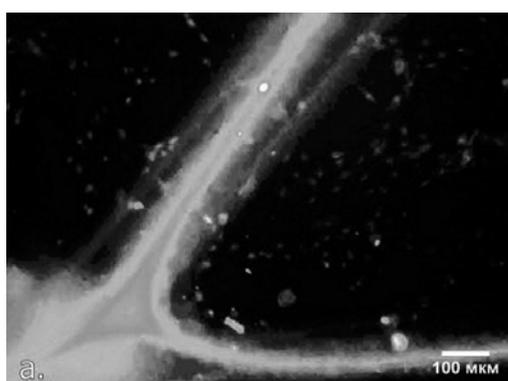
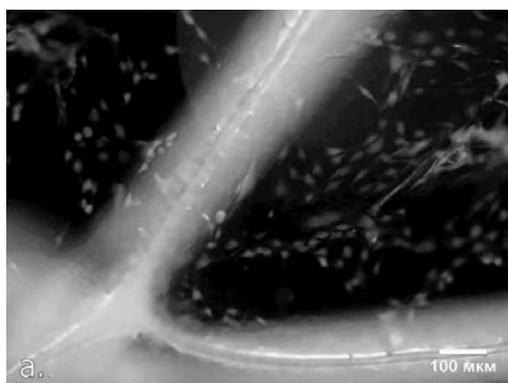


Рис. 1. Вид поверхности ЧП (а, с) и полипропиленового сетчатого протеза без покрытия (b) и покрытого поликапролактоном (d) на 3 сут культивирования с первичными фибробластами крысы (2×10^6 кл). ЧП с сеткой с покрытием (с, d) и без (а, b)

На 14 сут культивирования *in vitro*, на нитях необработанной сетки наблюдали формирование монослоя фибробластов, прорастающих из узловых регионов и распространяющихся вдоль волокон (рис. 2). Ранее в аналогичной экспериментальной модели с МСК подобного эффекта не наблюдали. В эти же сроки на поверхности полимерного покрытия наблюдали формирование относительно равномерного клеточного монослоя (рис. 2) без заметной деструкции полимера.



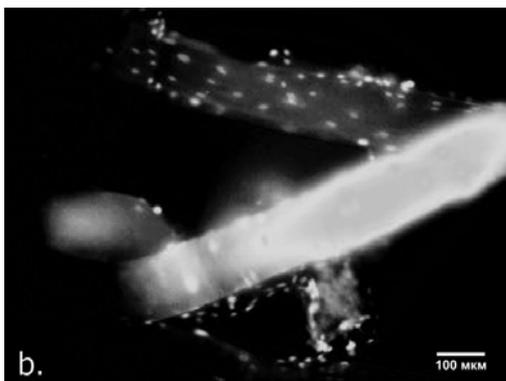


Рис. 2. Вид поверхности полипропиленового сетчатого протеза покрытого поликапролактоном (а) и без покрытия (b) на 14 сут культивирования с первичными фибробластами крысы (2×10^6 кл). Слева красная аутофлуоресценция элементов сетки и цитоплазмы метаболически активных клеток (резорфурина) и справа синее свечение ядер клеток (DAPI)

Сформированное на поверхности сетчатого полипропиленового протеза покрытие из поликапролактона увеличивает адгезионные свойства эндопротеза и обеспечивает формирование на его поверхности монослоя метаболически активных фибробластов при культивировании *in vitro*. Данное свойство может быть использовано для закрепления аутологичных клеток на поверхности эндопротеза.

Область применения: модификация поверхности эндопротеза для герниопластики, клеточная трансплантология, регенеративная медицина.

Рекомендации по использованию: предложенный метод формирования адгезионного интерфейса на поверхности эндопротеза может быть использован для создания биосовместимого покрытия, которое улучшает показатели адгезии клеточных элементов соединительной ткани в месте имплантации, а также для предимплантационного закрепления на его поверхности аутологичных клеток *in vitro*. Кроме того, покрытие может быть использовано в качестве депо биологически активных соединений (антибиотики, инсулин, ростовые факторы), что обеспечит адресную доставку этих соединений и стимуляцию репаративных процессов в области оперативного вмешательства.

Предложения по сотрудничеству: консультативная помощь при внедрении, изготовление по заказам единичных изделий и малых партий продукции, совместное доведение технологии до промышленного уровня, совместные исследования в области разработки и применения клеточных технологий в трансплантологии.

Adhesion interface for using of autologous cells in hernioplasty

D.R. Petrenyov, V.V. Bereschenko, Y.V. Voropaev, A.N. Lyzikov

The aim of the study was to evaluate the possibility of fixation of alive autologic fibroblasts on polypropylene mesh implant by forming adhesion interface for cells on its surface.

The adhesion interface on the surface of polypropylene mesh implant was formed by evaporation of solvent from polycaprolactone solution on the glass surface under laminar air flow. The primary rat skin fibroblasts were used to evaluate the dynamics of cell growth on the surface of intact and treated implants for 14 days.

Coated implants demonstrated the improved ability to adhere fibroblasts as evaluated after 24 hours after addition of cells. Small cell clusters were identified on the 3rd day of incubation in the samples coated with polycaprolactone, but not in intact implants. The cellular monolayer growth through mesh knots was found on the surface of intact implants on the 14 day. It was demonstrated what coated implants in this time were almost totally covered with metabolically active fibroblasts.

Coating of polypropylene mesh implants with polycaprolactone could improve the adhesion of cells *in vitro* and promote the fixation of autologic cells on the surface of polypropylene implants before implantation. Moreover, this coating could be used as a “depot” of biologically active substances (growth factors, antibiotics etc.) and enhance the reparative processes.

Field of application: modification of implant surface for hernioplasty, cell transplantation, regenerative medicine.

Offers for cooperation: joint research.